



TITLE:

分泌型亜鉛要求性酵素活性化機構
の分子機序に関する解析(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

藤本, 重行

CITATION:

藤本, 重行. 分泌型亜鉛要求性酵素活性化機構の分子機序に関する解析.
京都大学, 2016, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2016-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20069>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	藤本 重行
論文題目	分泌型亜鉛要求性酵素活性化機構の分子機序に関する解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>分泌型亜鉛要求性酵素は早期分泌経路で亜鉛を獲得し活性化する。これまでの研究から、早期分泌経路への亜鉛輸送は2つの亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5-ZnT6ヘテロダイマー(ZnT5-ZnT6)及びZnT7ホモダイマー(ZnT7))が担っており、これらは分泌型亜鉛要求性酵素の活性化に重要な働きを有していることが推察されている。しかしながら、細胞内亜鉛が亜鉛トランスポーターを介してどのような動態制御を受け各酵素に受け渡されるのかについての詳細な分子機序の解析はほとんど行われていない。そこで、分泌型亜鉛要求性酵素の一つ組織非特異的アルカリホスファターゼ(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP)をモデル酵素として使用し、その活性化の分子機序について解析を実施した。</p> <p>第1章では、TNAPの活性化に必要と考えられる細胞質内亜鉛の早期分泌経路への送達機構について解析した。細胞質内亜鉛濃度を正常に保つために働く ZnT1、メタロチオネイン(MT)、ZnT4 の三者を欠損した三重欠損ニワトリ DT40 細胞(<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>細胞)を用いて、細胞内亜鉛レベルを変化させ、TNAP 活性に及ぼす影響を解析した。その結果、<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>細胞は野生株細胞と比べて細胞質内亜鉛レベルが有意に増加したにも関わらず、TNAP 活性が著しく低下するという表現型を示した。この <i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>細胞にヒト ZnT1 (hZnT1)、マウス MT-1 (mMt-1)、hZnT4 全てを発現させると、この低下した TNAP 活性は、野生株細胞のそれと同等のレベルにまで回復した。しかしながら、<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>細胞に亜鉛輸送活性を欠いた hZnT1 及び hZnT4 変異体を発現させると、TNAP 活性は回復しなかった。さらに、<i>ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}</i>細胞における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 の機能を解析し、TNAP 活性の低下が両複合体の機能消失が原因ではないことを明らかにした。これらの結果から、ZnT1、MT、ZnT4 は細胞質内亜鉛を ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に効率よく受け渡す機構の一端を担うことで、TNAP 活性化に関与することが示唆された。</p> <p>第2章では、早期分泌経路内腔における ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 を介した TNAP 活性化機構について解析した。ZnT5-ZnT6 及び ZnT7 に内在する TNAP 活性化に必要な機能モチーフを探索した結果、早期分泌経路内腔に位置すると予想されるルミナルループ(luminal loop, LL)領域に、ZnT5 や ZnT7 やそれらのオーソログ分子のみに保存された複数のアミノ酸残基を見出した。hZnT5 のアラニン置換体を作製し、これらのアミノ酸残基の TNAP 活性化に対する機能を精査した結果、2つ目の LL (LL2) の Pro-Pro 配列をアラニンに置換した変異体 (PP-AA 変異体) は、細胞質から早期分泌経路の内腔へと正常に亜鉛を輸送できるにも関わらず、TNAP を十分に活性化できないことが判明した。PP-AA 変異体を発現させた細胞においては、アポ型 TNAP の発現が増加しており、低下した TNAP 活性は亜鉛を添加することで濃度依存的に回復した。また、ZnT5-ZnT6 や ZnT7 の立体構造モデルを用いて、Pro-Pro 配列が、ZnT5-ZnT6 や ZnT7 により膜輸送された亜鉛を TNAP に効率的に受け渡すために重要な空間配置を占めると考えられることを示した。</p> <p>本研究の結果から、早期分泌経路における TNAP 活性化には、細胞質及び早期分泌経路内腔において、単に亜鉛濃度に依存した受動的な亜鉛の受け渡しではなく、ZnT トランスポーターを介した厳密な制御機構が働いていることが強く示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

早期分泌経路への亜鉛輸送は2つの亜鉛トランスポーター複合体(ZnT5-ZnT6ヘテロダイマー(ZnT5-ZnT6)及びZnT7ホモダイマー(ZnT7))が担っており、これらは分泌型亜鉛要求性酵素の活性化に重要な働きを有していることが推察されている。しかしながら、細胞内亜鉛が亜鉛トランスポーターを介してどのような動態制御を受け酵素に受け渡されるのかについての詳細な分子機序についての解析はほとんど行われていない。本研究は、分泌型亜鉛要求性酵素の一つである組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)をモデル酵素として使用し、その活性化の分子機序を解析した結果をまとめたものであり、以下のような知見を得ている。

- 1) *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*細胞は、野生株細胞と比べて細胞質内亜鉛レベルが有意に増加したにも関わらず、TNAPを十分に活性化できないことを示した。また、このTNAPの活性減少が、ヒトZnT1 (hZnT1)、マウスMT-1 (mMt-1)、hZnT4をそれぞれ発現させることで回復されることを示した。
- 2) *ZnT1^{-/-}MT^{-/-}ZnT4^{-/-}*細胞においては、ZnT5-ZnT6及びZnT7がTNAPを活性化させる機能を保持しているにも関わらず、その機能を十分に発揮できないことを明示し、ZnT1、MT、ZnT4が細胞質内亜鉛をZnT5-ZnT6及びZnT7に効率よく受け渡す機構の一端を担うことで、TNAP活性化に関与する可能性を示した。
- 3) TNAP活性化に必要な機能モチーフとして、ZnT5-ZnT6及びZnT7の早期分泌経路内腔に位置すると予想されるルミナルループ内にPro-Pro配列を同定した。Pro-Pro配列をアラニンに置換した変異体 (PP-AA変異体) は、細胞質から早期分泌経路内腔へ正常に亜鉛を輸送できるにも関わらず、TNAPを十分に活性化できないことを明らかにした。
- 4) PP-AA変異により低下したTNAP活性は、亜鉛を添加することで濃度依存的に回復することを示した。また、ZnT5-ZnT6やZnT7の立体構造モデルを用いて、Pro-Pro配列が、ZnT5-ZnT6やZnT7により膜輸送された亜鉛をTNAPに効率的に受け渡すために重要な空間配置を占めると考えられることを示した。

以上のように、本研究は、TNAPの活性化には、細胞質及び早期分泌経路内腔のどちらにおいても、ZnTトランスポーターを介した厳密な制御機構が働いていることを強く示唆する新たな知見を示した成果として、生化学に大きく貢献するものである。したがって、申請者は生命科学に関する高度で幅広い知識、専攻分野における優れた研究能力を有し、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示していると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されていた。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成28年10月12日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日